

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU



To:

THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA  
PATENT OFFICE  
Kyodo Bldg.  
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0013  
Japan

Date of mailing (day/month/year) 20 February 2004 (20.02.2004)	
Applicant's or agent's file reference DC0050	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP2003/016182	International filing date (day/month/year) 17 December 2003 (17.12.2003)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 18 December 2002 (18.12.2002)
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
18 Dece 2002 (18.12.2002)	2002-366389	JP	12 Febr 2004 (12.02.2004)
10 Octo 2003 (10.10.2003)	2003-351560	JP	12 Febr 2004 (12.02.2004)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.70.10

Authorized officer

Alexia SAPIN (Fax 338 7010)

Telephone No. (41-22) 338 8439

DOCKET NO.: 273891US0XPCT

10/539281  
JC17 Rec'd PCT/PTO 16 JUN 2005

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Kimiyasu ISOBE, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/16182

INTERNATIONAL FILING DATE: December 17, 2003

FOR: D-AMINOACYLASE

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
Japan	2002-366389	18 December 2002
Japan	2003-351560	10 October 2003

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/16182. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

Rec'd PCT/PTO 16 JUN 2005  
PCT/JP 03/16182  
17.12.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年12月18日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-366389  
[ST. 10/C]: [JP2002-366389]

出 願 人  
Applicant(s): 第一化学薬品株式会社  
磯部 公安

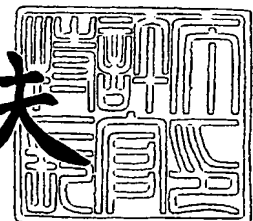
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

RECEIVED  
12 FEB 2004  
WIPO PCT

2004年 1月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P06061412

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県岩手郡松尾村松尾 4 - 1 1 5 第一化学薬品株式会社  
岩手工場生産技術センター内

【氏名】 山口 成樹

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県岩手郡松尾村松尾 4 - 1 1 5 第一化学薬品株式会社  
岩手工場生産技術センター内

【氏名】 小林 正幸

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県岩手郡松尾村松尾 4 - 1 1 5 第一化学薬品株式会社  
岩手工場生産技術センター内

【氏名】 熊谷 伸弥

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県盛岡市黒石野 3 丁目 1 5 - 4 0

【氏名】 磯部 公安

【特許出願人】

【識別番号】 390037327

【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 302068704

【氏名又は名称】 磯部 公安

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 D-アミノアシラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の酵素学的性質を有するD-アミノアシラーゼ。

(a) 作用: N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。

(b) 分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における測定で、分子量約55,000ダルトンを示す。

(c) 等電点: 変性系2次元電気泳動における測定で、等電点5.3を示す。

(d) 基質特異性: 脂肪族アミノ酸によく作用し、特にバリンによく作用する。基質として、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンに作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。

(e) 温度安定性: pH8.5で1日加温した場合、4℃から30℃まで比較的安定である。

(f) 至適温度: pH8で反応させた場合、37℃において作用が至適である。

(g) pH安定性: 温度30℃で1日加温した場合、pH9付近で安定であり、pH6付近からpH11付近でも比較的安定である。

(h) 至適pH: 温度37℃で反応させた場合、pH8からpH8.5付近で最もよく作用する。

(i) 金属イオンの影響: 1mmol/Lの $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で活性が阻害される。

(j) 阻害剤の影響: 5mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

【請求項2】 N-アセチル-D、L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸からD-アミノ酸を生成するD-アミノアシラーゼを生産するデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物。

【請求項3】 デフルビバクター・エスピー (Defluviibacter sp.) A131-3と命名され、FERM P-19045として寄託された請求項2記載の微生物。

【請求項4】 請求項1記載のD-アミノアシラーゼを生産するものである請求項2又は3記載の微生物。

【請求項5】 請求項2～4のいずれか1項記載の微生物を培養し、その培養物から当該D-アミノアシラーゼを採取することを特徴とする請求項1記載のD-アミノアシラーゼの製造方法。

【請求項6】 請求項1記載のD-アミノアシラーゼをN-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸に作用させることを特徴とするD-アミノ酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、デフルビバクター (Defluviibacter) 属細菌により生産される新規なD-アミノアシラーゼ及び該D-アミノアシラーゼを用いた医薬品、化成品等に利用されるD-アミノ酸の製造法に関する。

【0002】

【従来技術】

近年、D-アミノ酸が医薬品等へ原料として有効であることが明らかになり、光学的に純度の高いD-アミノ酸を安価に製造することが産業上重要な課題となっている。この方法として一般的に、化学合成したラセミ体を分割する方法が用いられ、特に副生成物や多量の廃溶媒を発生させない酵素法が現在注目されている。

【0003】

従来、D-アミノ酸の製造方法として、N-アセチル-D, L-アミノ酸にD-アミノアシラーゼを作用させ、D-アミノ酸を特異的に得る方法が知られていて工業化されている。

D-アミノアシラーゼを産生する微生物として、シュードモナス・エスピー (

*Pseudomonas* sp. ) AAA6029株 (例えば、非特許文献1参照)、スト렙トミセス・オリバゼウス (*Streptomyces olivaceus*) S・62株 (例えば、特許文献1参照)、アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans*) A-6株 (例えば、特許文献2参照)等が挙げられ、これらから由来のD-アミノアシラーゼが報告されている。

#### 【0004】

しかしながら、これらのD-アミノアシラーゼはN-アセチル-D, L-アミノ酸の種類により反応特性が大きく異なり、公知のD-アミノアシラーゼを用いて広範囲のD-アミノ酸を安価に製造することは困難であった。

また、D-アミノ酸を工業的に製造するために、遺伝子組み換え技術を用いて生産されたD-アミノアシラーゼを使用する方法 (例えば、特許文献3及び4参照) が知られているが、本質的に反応性の低いD-アミノ酸を製造するには多量の酵素が必要であるため、価格や生産量に制限がある。

#### 【0005】

##### 【特許文献1】

特開昭53-59092号公報

##### 【特許文献2】

特開平2-234677号公報

##### 【特許文献3】

特開2001-185号公報

##### 【特許文献4】

特開2001-275688号公報

##### 【非特許文献1】

Chemical and Pharmaceutical Bulletin (米国)、1978年、第26巻、

p2698

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来報告されている酵素では反応性が低いN-アセチル-D



アミノ酸に対し高い活性を有するD-アミノアシラーゼを生産する新規微生物を自然界より見出し、D-アミノ酸を安価に製造するための新規なD-アミノアシラーゼの製造方法及び該新規なD-アミノアシラーゼを用いたD-アミノ酸の製造方法を提供することにある。また、該新規なD-アミノアシラーゼを産生する微生物を提供することにある。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上述の問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来の酵素では反応性が低い基質に対してもよく作用するD-アミノアシラーゼを生産するデフルビバクター (Defluviobacter) 属細菌を自然界より見出し、本発明を完成した。

#### 【0008】

すなわち、本発明は、次の酵素学的性質を有するD-アミノアシラーゼを提供するものである。

(a) 作用: N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。

(b) 分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における測定で、分子量約55,000ダルトンを示す。

(c) 等電点: 変性系2次元電気泳動における測定で、等電点5.3を示す。

(d) 基質特異性: 脂肪族アミノ酸によく作用し、特にバリンによく作用する。基質として、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンに作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。

(e) 温度安定性: pH8.5で1日加温した場合、4℃から30℃まで比較的安定である。

(f) 至適温度: pH8で反応させた場合、37℃において作用が至適である。

(g) pH安定性: 温度30℃で1日加温した場合、pH9付近で安定であり、pH6

付近から pH 11 付近でも比較的安定である。

(h) 至適 pH: 温度 37℃ で反応させる場合、pH 8 から pH 8.5 付近で最もよく作用する。

(i) 金属イオンの影響: 1 mmol/L の  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  で活性が阻害される。

(j) 阻害剤の影響: 5 mmol/L のジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

本発明は、N-アセチル-D, L-アミノ酸又は N-アセチル-D-アミノ酸を D-アミノ酸に効率的に変換する D-アミノアシラーゼを産生するデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物を提供するものである。

また、本発明は、該微生物を培養し、その培養物より採取した微生物菌体処理物から当該 D-アミノアシラーゼを採取することを特徴とする D-アミノアシラーゼの製造方法を提供するものである。

更に、本発明は、当該 D-アミノアシラーゼを N-アセチル-D, L-アミノ酸又は N-アセチル-D-アミノ酸に作用させることを特徴とする D-アミノ酸の製造方法を提供するものである。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、新規な D-アミノアシラーゼを産生する能力を有する微生物を自然界から見出し、新規な D-アミノアシラーゼの諸性質を明らかにし、D-アミノ酸の製造に有効であることを明らかにすることにより確立された。

#### 【0010】

すなわち、本発明の新規な D-アミノアシラーゼを生産する微生物としては、上記の本発明 D-アミノアシラーゼを生産するものである限り特に限定されないが、本発明で見出した新規な D-アミノアシラーゼ生産菌の一例は、第一化学薬品株式会社岩手工場内の土壤中より単離されたデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物であり、例えば、デフルビバクター エスピー A131-3 (Defluviobacter sp. A131-3) 等が挙げられる。当該 A131-3 株は次のような菌学的性質を有する。

## 【0011】

(形態的所見)

1. 細胞形態：桿菌 (0.6 ~ 0.7 × 1.5 ~ 2.0  $\mu$ m)
2. グラム染色：陰性
3. 孢子形成：なし
4. 運動性：あり
5. 鞭毛：あり
6. 普通寒天培地：円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、くすんだ灰色から黄淡色

## 【0012】

(生理学的性質)

1. カタラーゼ生産：陽性
2. オキシダーゼ生産：陽性
3. 酸／ガス生産（グルコース）：陰性
4. O／Fテスト（グルコース）：陰性
5. 嫌気性生育：しない
6. 好気性成育：絶対好気性

## 【0013】

(生物学的性状)

API 20 NE 同定システム (bioMerieux France) を使い、その測定方法に従い生化学的性状試験を実施した。

1. 硝酸塩還元：陰性
2. インドール生産：陰性
3. ブドウ糖 酸性化：陰性
4. アルギニンジヒドラーゼ：陰性
5. ウレアーゼ：陰性
6. エスクリン加水分解：陰性
7. ゼラチン加水分解：陰性
8.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ：陰性

## 9. チトクロームオキシダーゼ: 陽性

【0014】

(資化性試験)

1. ブドウ糖: 陽性
2. L-アラビノース: 陰性
3. D-マンノース: 陽性
4. D-マンニトール: 陰性
5. N-アセチル-D-グルコサミン: 陽性
6. マルトース: 陰性
7. グルコン酸カリウム: 陽性
8. n-カプリン酸: 陰性
9. アジピン酸: 陰性
10. D, L-リンゴ酸: 陽性
11. クエン酸ナトリウム: 陰性
12. 酢酸フェニル: 陰性
13. 2, 4-ジクロロフェノール: 陰性
14. フェノール: 陰性

【0015】

(脂肪酸組成分析)

脂肪酸組成測定には、ガスクロマトグラフィーシステム HP 6890 (Hewlett-Packard, CA, USA) を用い、菌種データ照合は Sherlock Microbial Identification System (MIDI) を用い、データベースは MIS Standard Libraries (MIDI) の TSB A (Version 4.0) を用いた。

1. 要脂肪酸:  $C_{18:1\omega 7c}$  の直鎖・モノ不飽和脂肪酸
2. ヒドロキシ脂肪酸:  $C_{12:03OH}$

【0016】

(ユビキノン分析)

高速液体クロマトグラフを用いユビキノン標準試料のリテンションタイムの比較から分子種の同定を行った。

## 1. 主要ユビキノン系: Q-10

## 【0017】

(細胞壁アミノ酸分析)

高性能薄層プレート HPTLC (Merck, NJ, USA) を用いて、細胞壁ペプチドグルカンに含まれる特異的アミノ酸を対照として展開し、特異的アミノ酸の検出を行った。

## 1. 細胞壁アミノ酸: meso-ジアミノピペリン酸

## 【0018】

(16S rDNA-Full塩基配列解析)

BLASTを用いてDNA塩基配列データベース (GenBank) に対して相同性検索を行った。

## 1. デフルビバクター ルサチエンシス (Defluviibacter lusatiensis DSM11099) と 99.9% の 16S rDNA 相同性

## 【0019】

以上の生化学的および菌学的諸性質から、自然界より新たに見出した微生物はデフルビバクター (Defluviibacter) 属の細菌に分類されたが、同様の性質を持つ微生物としてはデフルビバクター (Defluviibacter) 属の Defluviibacter lusatiensis DSM 11099 が報告されている (Defluviibacter lusatie gen. nov., sp. nov., a new chlorophenol-degrading member of the  $\alpha$ -2 subgroup of proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol., 1999, 22, 197-204.)。しかし、公知のデフルビバクター (Defluviibacter) 属の細菌が、D-アミノアシラーゼを産性することの記載はなく、デフルビバクター (Defluviibacter) 属の微生物が D-アミノアシラーゼを産生する能力を持つことは、本発明で初めて明らかになった。本発明で見出した菌株はデフルビバクター・エスピー A131-3 (Defluviibacter sp. A131-3) と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに FERMP-19045 として寄託した。

## 【0020】

そして、本発明で見出した新規な D-アミノアシラーゼを得るためには、デフルビバクター属の細菌、例えばデフルビバクター・エスピー A131-3 (De

fluvibacter sp. A131-3) を親株として人工的に変異処理及び突然変異、又は組み換えDNA操作等の一般的な酵素の生産性及び性質を向上させる方法で得られた変異株や改良株を用いることも可能である。

#### 【0021】

本発明の新規なD-アミノアシラーゼは、当該微生物を適当な培地に摂取し微生物を増殖させることにより得ることができる。

#### 【0022】

ここで使用される培地は、通常の微生物の培地に用いられ、当該菌体が生育し新規なD-アミノアシラーゼが生産されるものであれば、特に限定されないが、該培地中には、資化し得る窒素源、炭素源、無機塩類を適当量含有せしめておくことが好ましい。

#### 【0023】

窒素源、炭素源、無機塩類は特に制限されない。

例えば窒素源として、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等が挙げられる。炭素源として、グルコース、フルクトース、ショ糖、グリセリン、酢酸等が挙げられる。無機塩類として、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硝酸アンモニウム、硫酸鉄、硫酸亜鉛等が挙げられる。

また、本発明のD-アミノアシラーゼの生成に誘導物質等は特に必要ないが、D-アミノアシラーゼ高産生化のために、誘導化物質として、N-アセチル-D又はD, L-アミノ酸等のアシル化アミノ酸誘導体を培地中に0.01~0.5重量% (以下単に%と記載する) 程度添加することが望ましく、特にN-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン等が誘導物質として有効である。

#### 【0024】

培地のpHは、菌が生育可能な範囲であればいずれのpH範囲でもよいが、特に7~9程度が好ましく、培養温度は15~40℃、より好ましくは25~37℃である。培養時間は、20~48時間液体培地を用い振とう培養することが好ましいが、用いる培地によって時間が変動する。また、同様の培地に寒天を加えた固体培地でも菌の培養を行うことが可能である。

#### 【0025】

このような方法によって得られた微生物菌体中に、D-アミノアシラーゼが産生される。

培養物からの目的物質であるD-アミノアシラーゼの採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製手段に準じて行うことができる。すなわち、培養物を遠心又はろ過などによって菌体を分離し、機械的磨砕又は超音波破碎等により菌体を破碎し、その破碎液から通常の分離手段、例えば、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等により採取、精製する方法が挙げられる。

#### 【0026】

このようにして得られた、本菌株デフルビバクター・エスピー A131-3 株より産生されるD-アミノアシラーゼの酵素学的性質は、次のとおりである。

#### 【0027】

(1) 作用：N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。

(2) 分子量：定法に則り、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（第一化学薬品（株）製、PAGミニ「第一」10/20）を行い、タンパク質分子量マーカー（第一化学薬品（株）製、タンパク質分子量マーカー「第一」・III）の移動度より分子量を求めた結果、約55,000ダルトンを示す。

(3) 等電点：2次元電気泳動法に則り、変性系2次元電気泳動（第一化学薬品製、IPGチューブゲル「第一」4-10及び、PAGラージ「第一」2D-10/20）を行い、2D-タンパク質等電点マーカー（第一化学薬品（株）製、2D-タンパク質等電点マーカー「第一」）の移動度より等電点を求めた結果、pI値5.3を示す。

(4) 基質特異性：以下のN-アセチル-D-アミノ酸及びN-アセチル-L-アミノ酸を基質として、D-アミノ酸オキシダーゼ又はL-アミノ酸オキシダーゼを組み合わせる方法で、本発明のアシラーゼの基質特異性を確認した。以下のN-アセチル-D-アミノ酸に作用し、N-アセチル-L-アミノ酸には作用しない。N-アセチル-D-アミノ酸としてN-アセチル-D-バリンに最もよく作用し、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセ

チルーD-チロシンにも作用する。N-アセチルーL-バリン、N-アセチルーL-ロイシン、N-アセチルーL-メチオニン、N-アセチルーL-トリプトファン、N-アセチルーL-フェニルアラニン、N-アセチルーL-チロシンには作用しない。

尚、L-アミノ酸の測定は、下記に示す活性測定法で、D-アミノ酸オキシダーゼの代わりにL-アミノ酸オキシダーゼを使用する。

(5) 温度安定性: pH 8.5 で 4℃、25℃、30℃、40℃、50℃ で 1 日加温し、以下の活性測定法に則り残存する酵素活性を測定した結果、4℃ から 30℃ まで比較的安定である。

(6) 至適温度: pH 8 で 4℃、25℃、30℃、37℃、40℃ で以下の活性測定法に則り酵素活性を測定した結果、37℃ において作用が至適である。

(7) pH 安定性: 温度 30℃ で pH 4 から 12 で 1 日加温後、以下の活性測定法に則り残存する酵素活性を測定した結果、pH 9 付近で安定であり、pH 6 付近から pH 11 付近までは比較的安定である。

(8) 至適 pH: 温度 37℃ で pH 6 から 12 で以下の活性測定法に則り酵素活性を測定した結果、pH 8 から pH 8.5 付近で最もよく作用する。

(9) 金属イオンの影響: 酵素液に金属イオンとして、塩化カルシウム・2水和物、塩化鉄 (III)・6水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルト (II)・6水和物、塩化カリウム、塩化ニッケル・6水和物、塩化マグネシウム・6水和物、硫酸銅 (II)・5水和物、塩化マンガン (II)・4水和物、塩化亜鉛、モリブデン酸ナトリウムを、1 mmol/L になるように添加して、N-アセチルーD, L-バリンと反応させ、生成されたD-バリン量を HPLC で測定した結果、1 mmol/L の  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  で活性が阻害される。

(10) 阻害剤の影響: 酵素液に阻害剤として、エチレンジアミン四酢酸、2-メルカプトエタノール、N-エチルマレイミド、o-フェナントリン、L-システイン、ヨードアセトアミド、ジチオスレイトール 5 mmol/L になるように添加して、N-アセチルーD, L-バリンと反応させ、生成したD-バリン量を HPLC で測定した結果、5 mmol/L のジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。



## 【0028】

アミノ酸オキシダーゼを用いたアシラーゼ活性の測定方法: 10 mL の 0.1 mol/L リン酸緩衝液 pH8 に 4-Aminoantipyrine 0.61 mg (ナカライテスク株式会社製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22 mg (Dojindo Laboratories 製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30 unit (SIGMA 社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA 社製、Code:A-9128) 又は L-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA 社製、Code:A-5147) を溶解して発色試薬とした。この発色試薬 500  $\mu$ L と 100 mmol/L の N-アセチル-D, L-バリン 100  $\mu$ L、測定酵素サンプル 100  $\mu$ L、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH8) 300  $\mu$ L を含む 1 mL の反応液を 37  $^{\circ}$ C で 30 分間加温後、分光光度計を用い 555 nm の吸光度値を測定し、D-バリンを用いて作成した検量線から酵素活性を求める。

尚、1 U は 1 分間に 1  $\mu$ mol の D-バリンの生成を触媒する酵素量とする。

## 【0029】

HPLC を用いたアシラーゼの測定方法: Inertsil ODS-2 (GLサイエンス(株) 製) カラムを用い、0.015% 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム (pH2.5) 80:アセトニトリル 20 緩衝液を用い、流速 0.5 mL/分、検出 230 nm、カラム温度 30  $^{\circ}$ C で分析した。酵素活性は検出されたアセチル体と遊離体の面積比から、無添加を 100 として分割率を求め、相対活性値で表す。

## 【0030】

得られた新規な D-アミノアシラーゼは、N-アセチル-D-アミノ酸に特異的に作用し、N-アセチル-L-アミノ酸には作用しないので、N-アセチル-D-アミノ酸から D-アミノ酸を製造するためにも利用できるが、N-アセチル-D, L-アミノ酸から D-アミノ酸を分割分離するためにも使用される。すなわち、D, L-アミノ酸をアセチル化して N-アセチル-D, L-アミノ酸とし、次に D-アミノアシラーゼを加えて N-アセチル-D-アミノ酸を加水分解し D-アミノ酸を生成することにより、D-アミノ酸と L-アミノ酸を分離することが可能である。なお、N-アセチル-D-アミノ酸のみを用いれば、D-アミノ酸だけが得られる。

## 【0031】

D-アミノアシラーゼをN-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸に作用させる場合、D-アミノアシラーゼ添加量は、通常1～1000 U/mL基質溶液の範囲で、好ましくは50～500 U/mL基質溶液である。また、N-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸量は1～40重量%（以下%と記載する）、更には5～25%水溶液とすることが好ましい。

反応温度は10～50℃、更には15～45℃であるのが好ましく、反応はpH 6.5～10.5、更には7.5～10であるのが好ましい。また、反応時間は0.2～10日間、更には1～5日間であるのが好ましい。

反応液からのD-アミノ酸の分離回収は、例えば、濃縮、等電点、沈殿、イオン交換樹脂処理、膜分離等の公知の方法で行なわれる。

## 【0032】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

## 【0033】

## 実施例1 デフルビバクター エスピー A131-3株の単離

第一化学薬品株式会社岩手工場内の土壌を採取し、次法により菌体を採取した。

培地として、硝酸アンモニウム0.2%、リン酸二水素カリウム0.2%、リン酸水素二ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%、誘導物質N-アセチル-D, L-バリン0.2%を含むpH8.5の培地に少量の土壌を添加し30℃で試験管を用いて振盪培養した。次に同様の培地で寒天2%を含む同一培地組成の平板培地上に培養液をプレートアウトし、30℃で培養後生育した微生物を分離した。

分離した微生物を再度上記と同一組成の培地を用いて試験管を振盪培養し、以下の2つの方法で従来とは異なるD-アミノアシラーゼを生産する能力を有する微生物を選抜した。

## 【0034】

(1) D-アミノアシラーゼ活性測定法: 5mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH 8に4-Aminoantipyrine 0.61mg (ナカライテスク株式会社製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg (Dojindo Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30 unit (SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA社製、Code:A-9128)を溶解して発色試薬とした。この発色試薬100 $\mu$ Lと、100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン100 $\mu$ Lと上記培養液を遠心分離し再懸濁を行った菌体液100 $\mu$ Lをマイクロプレートのセル中で混合し37℃で1時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて555nmの吸光度を測定した。発色が確認された菌体についてD-アミノアシラーゼ活性を持った菌株として選んだ。

## 【0035】

(2) HPLC分析による生産菌の選抜: 次に上記の発色法でN-アセチル-D, L-バリンに対して強い活性を示すことが確認された菌株について、下記のHPLCによる分析を行った。

カラム: SUMICHIRAL OA-5000 (5 $\mu$ m、4.6mm $\phi$ ×150mm)、移動相: 2mmol/L硫酸銅:アセトニトリル=90:10、温度: 40℃、流速: 0.8mL/min、検出: 230nmの条件で、培養後遠心分離した菌体と100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリンの反応液30 $\mu$ Lを用いて、N-アセチル-D, L-アミノ酸の分解とD-アミノ酸あるいはL-アミノ酸の生成を、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-L-バリンとD-バリン、L-バリンが溶出される時間のピーク面積より分析した。その結果、発色法で選抜した菌株はいずれもN-アセチル-D-バリンが速やかに減少し、N-アセチル-D-バリンの減少量に相当するD-バリンの増加が認められた。

次に、各種のN-アセチル-D, L-アミノ酸との反応を比較して、D-アミノ酸に特異性が高く、更に既存のD-アミノアシラーゼとは異なりD-バリンに対する反応性が優れている酵素を産生する微生物を新規なD-アミノアシラーゼの生産菌として選択した。

このような方法を経て得られた菌株は、前記の菌学的性質を有するものであった。この菌株をデフルビバクター エスピー A131-3株と命名した。

#### 【0036】

##### 実施例2 D-アミノアシラーゼの製造

デフルビバクター エスピー A131-3株を、実施例1で使用した培地に粉末酵母エキスD-3 0.1% (和光純薬工業(株)製、Code:390-00531)、ポリペプトン0.1% (和光純薬工業(株)製、Code:394-00115)、塩化ナトリウム0.05%を添加したpH8培地20Lで、ジャーファーマンターを用い30℃、150 r/min、27時間通気攪拌培養した。培養終了時の濁度(ABS<sub>660nm</sub>)は1.52で、pH7.75であった。

培養後、冷却遠心分離機(日立工機(株)製)を用い、4000 r/min、60分間、遠心分離を行い集菌した。集菌した菌体を、20 mmol/L トリシュー塩酸(pH8)緩衝液で洗浄した後、再度遠心分離機により菌体を分離し112 gの菌体を得た。得られた菌体は、-80℃で凍結保存を行った。

凍結保存菌体を融解し、菌体量の3倍の20 mmol/L トリシュー塩酸(pH8)緩衝液340 mLで懸濁後、低温室内(4℃)で攪拌しながら投入式超音波破碎機を用い、120分間超音波破碎を行った。破碎後、高速冷却遠心機(日立工機(株)製)で8000 r/min、4℃、60分間遠心分離後上清液365 mLを得た。これを粗酵素液とした。

なお、本菌株は、培養時にN-アセチル-D, L-バリンを添加しなくともD-アミノアシラーゼを産生したが、N-アセチル-D, L-バリンを添加することにより、その酵素生産量を2倍以上に増加することが可能であった。

#### 【0037】

##### 実施例3 D-アミノアシラーゼの精製

粗酵素液を透析チューブに詰め、0.1 mol/L 塩化ナトリウム含有20 mmol/L トリシュー塩酸(pH8)緩衝液中に投入し、低温室内(4℃)で攪拌を行いながら、数回緩衝液を交換し一昼夜透析を行った。透析終了後、高速冷却遠心機(日立工機(株)製)で8000 r/min、4℃、60分間遠心分離後上清液342 mLを得た。

この、透析終了液の1/3量について以下の精製を行った。透析の終了した14mLを、予め0.1mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリスー塩酸(pH8)緩衝液で平衡化したTOYOPEARL Super Q-650Mカラム(東ソー(株)製)(4.4cmφ×37.5cm)に供して酵素を吸着させた。次に0.1mmol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリスー塩酸(pH8)緩衝液1500mLでカラムを洗浄し、続いて0.1mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリスー塩酸(pH8)緩衝液5700mLと、0.3mol/L塩化ナトリウム含有20mmol/Lトリスー塩酸(pH8)緩衝液5700mLを用いて直線濃度勾配法で酵素を溶出した。カラム流下後は25mLずつ分取して、各フラクションのタンパク量(280nmの吸光度)とD-アミノアシラーゼ活性(下記の酵素活性測定法を参照)を測定し、活性画分を回収した。

各フラクションのD-アミノアシラーゼ酵素活性は、10mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg(ナカライテスク株式会社製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg(Dojindo Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30unit(SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1unit(SIGMA社製、Code:A-9128)を溶解して発色試薬とした。この発色試薬500μLと100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン100μL、測定酵素サンプル100μL、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH8)300μLを含む1mLの反応液を37℃で30分間反応後、分光光度計を用い555nmの吸光度値を測定した。

#### 【0038】

TOYOPEARL Super Q-650Mクロマトグラフィーで、D-アミノアシラーゼ活性が認められたフラクション画分(968mL)をビバフロー50(ザルトリウス(株)製)分画分子量10000の限外ろ過膜を用いて濃縮し、さらに、5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)で透析した。

この透析した酵素液160mLを予め5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したBIO-GEL TH(BIO-RAD社製)ハイドロキシアパタイトカラム(2.2cmφ×20cm)に吸着させた。

次に、5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) 350 mL でカラムを洗浄し、続いて 5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) 750 mL と 200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) 750 mL を用いて直線濃度勾配法で酵素を溶出した。カラム流下後は 25 mL ずつ分取して、各フラクションのタンパク量と D-アミノアシラーゼ活性を測定し、活性画分を回収した。

BIO-GEL HT (BIO-RAD 社製) によるヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーで得られた活性画分 280 mL を、ビバフロー 50 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量 10000 の限外ろ過膜を用いて、20 mL に濃縮した。

この濃縮液を、予め 0.3 mol/L 塩化ナトリウム含有 20 mmol/L トリシュー酸 (pH 8) 緩衝液で平衡化した Superdex 200 p. g カラム (Pharmacia Biotech 社製) (2.2 cm  $\phi$   $\times$  66 cm) に供し、同緩衝液を 1.5 mL/分の流速で流した。カラム流下後は 10 mL ずつ分取して、各フラクションのタンパク量と D-アミノアシラーゼ活性を測定した。

#### 【0039】

D-アミノアシラーゼ活性が確認された画分の少量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析に供し、不純蛋白質が混在しないことを確認した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、PAGミニ [第一] 10/20 (第一化学薬品 (株) 製) を用い、第一化学薬品 (株) の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動操作法に則って行った。SDS-サンプル処理液 (第一化学薬品 (株) 製) 50  $\mu$ L と精製フラクション 50  $\mu$ L を同量混合し、5 分間煮沸処理を行った。

PAGミニ [第一] 10/20 ゲルに、煮沸処理を行ったサンプルを 20  $\mu$ L 供し、40 mA の定電流で電気泳動を行い、ページブルー 83 染色液 (第一化学薬品 (株) 製) で染色後、目的の D-アミノアシラーゼと推定される蛋白質のバンドを確認した。

比活性 (蛋白質量に対する酵素活性の比率) 及び電気泳動で純度が高いことを確認した。この活性画分を集め、ビバフロー 50 (ザルトリウス (株) 製) 分画分

分子量 10000 の限外ろ過膜、さらにビバポア 10/20 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量 7500 の限外ろ過膜を用いて濃縮操作を行い、精製酵素として 28 mL 得た。

#### 【0040】

本精製法による酵素精製収率は表 1 のとおりであった。

#### 【0041】

【表 1】

工程名	液量 (mL)	総タンパク量 (mg)	総活性量 (KU)	比活性 (U/mg)	活性回収率 (%)
破碎遠心上清	114	4605	2707	588	100
SuperQ-650M	968	47	1334	28300	49
BIO-GEL HT	280	27	1125	41600	42
Superdex200	346	25	1003	40100	37
濃縮液	28	23	953	41400	35

#### 【0042】

#### 実施例 4 精製酵素の酵素学的性質

実施例 3 で得られたデフルビバクター エスピー A131-3 株由来の D-アミノアシラーゼ (以下、本酵素と記載することもある) の酵素学的性質を、以下の方法で測定した。

#### 【0043】

1. 分子量の測定は、前述の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (第一化学薬品 (株) 製、PAGミニ「第一」10/20) で測定を行った。タンパク質分子量マーカー (第一化学薬品 (株) 製、タンパク質分子量マーカー「第一」・III) フォスフォリラーゼ b (97, 400 ダルトン)、ウシ血清アルブミン (66, 267 ダルトン)、アルドラーゼ (42, 400 ダルトン)、カルボニックアンヒドラーゼ (30, 000 ダルトン)、トリプシンインヒビター (20, 100 ダルトン)、リゾチーム (14, 400 ダルトン) の移動度より求めた分子量は約 55, 000 ダルトンであった (図 1)。

#### 【0044】

2. ゲルろ過による分子量の測定は、Superdex 200 pg HR 10/30 (Pharmacia Biotech 社製) (1 cm  $\phi$   $\times$  30 cm) により、0.3 mol/L 塩化ナトリウム含有 20 mmol/L トリス-塩酸 (pH 8) 緩衝液で流速 1 mL/min、検出

280nmで分析を行った。分子量マーカにはLMW GEL FILTRATION CALIBRATION KIT (PHARMACIA BIOTECH社製) Bovine Serum Albumin (67,000ダルトン)、Ovalbumin (43,000ダルトン)、Chymotrypsinogen A (25,000ダルトン)、Ribonuclease A (13,700ダルトン) を用い、分子量と溶出時間との関係を求めた。本酵素を同じ条件で分析し算出した分子量は約56,000ダルトンであった。

#### 【0045】

3. タンパク質等電点は、2次元電気泳動法に則り、変性系2次元電気泳動(第一化学薬品(株)製、IPGチューブゲル「第一」4-10及びPAGラージ「第一」2D-10/20)を用い測定した。2D-タンパク質等電点マーカー(第一化学薬品(株)製、2D-タンパク質等電点マーカー「第一」) pI値5.1、5.2、5.3、5.4、5.7、6.0、6.2、6.4、6.5、6.7、6.8、7.0、7.1の移動度を基準として求めた本酵素のpI値は5.3であった。

#### 【0046】

4. 基質特異性は、前述したD及びL-アミノ酸オキシダーゼ発色試薬を用いた活性測定法に則り検討した。すなわち、初めに200  $\mu\text{mol/L}$ 、150  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ の各D-アミノ酸及びL-アミノ酸を基質として用いて反応し、得られた555nmの吸光度値と基質濃度との関係から酵素活性測定の検量線を作成した。

次に同様の発色試薬を用い基質として、100mmol/L N-アセチル-D, L-バリン、N-アセチル-D, L-メチオニン、N-アセチル-D, L-トリプトファン、N-アセチル-D, L-ロイシン、N-アセチル-D, L-フェニルアラニン、N-アセチル-D, L-チロシン、N-アセチル-D, L-グルタミン酸を用いて、以下の方法で各アセチルアミノ酸に対する反応を調べた。

すなわち、10mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg (ナカライテスク株式会社製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg (dojindo



Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30 unit (SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA社製、code:A-9128)又はL-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA社製、Code:A-5147)、を溶解して発色試薬とし、この発色試薬 500  $\mu$ L と 100 mmol/L の各アセチルアミノ酸基質溶液 100  $\mu$ L、一定濃度の本酵素液 100  $\mu$ L、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH8) 300  $\mu$ L を含む 1 mL の反応液を 37℃ で 30 分間加温後、分光光度計を用い 555 nm の吸光度値を測定し、各D-アミノ酸及びL-アミノ酸を用いて作成した検量線から酵素活性量を求めた。

尚、1 U は 1 分間に 1  $\mu$ mol/L の各D-アミノ酸及びL-アミノ酸の生成を触媒する酵素量とし、上記で求めたD-アミノ酸及びL-アミノ酸の濃度との関係式から算出した。

基質特異性は、N-アセチル-D-メチオニンを 100 にした場合と、N-アセチル-D-バリンを 100 にした場合の相対活性で表 2 に示す。

#### 【0047】

【表 2】

基質	相対活性 (%対Met)	相対活性 (%対Val)
N-Ac-D-Val	762	100
N-Ac-D-Met	100	13
N-Ac-D-Trp	1.1	0.2
N-Ac-D-Leu	555	73
N-Ac-D-Phe	37	4.8
N-Ac-D-Tyr	8.4	1.1
N-Ac-D-Glu	0	0
N-Ac-L-Val	0	0
N-Ac-L-Met	0	0
N-Ac-L-Trp	0	0
N-Ac-L-Leu	0	0
N-Ac-L-Phe	0	0
N-Ac-L-Tyr	0	0
N-Ac-L-Glu	0	0

#### 【0048】

N-アセチル-D-アミノ酸またはN-アセチル-L-アミノ酸を用いて反応を確認した結果、N-アセチル-D-アミノ酸のみに作用し、N-アセチル-L-アミノ酸にはまったく作用しなかった。N-アセチル-D-アミノ酸の中では

N-アセチル-D-バリンに最もよく作用し、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンにも作用した。しかし、N-アセチル-D-グルタミン酸には作用しなかった。N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシン及びN-アセチル-L-グルタミン酸のN-アセチル-L-アミノ酸には作用しなかった。

#### 【0049】

5. 温度安定性は、本酵素液をpH8.5で4℃、25℃、30℃、40℃、50℃で1日加温し、前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り加温処理後の残存活性を測定して確認した。本酵素の温度安定性を図2に示す。本酵素は、4℃から30℃までは安定であった。

#### 【0050】

6. 至適温度は、本酵素液をpH8で4℃、25℃、30℃、37℃、40℃で前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り活性測定を行って確認した。本酵素の至適温度を図3に示す。本酵素は、37℃において作用が至適であった。

#### 【0051】

7. pH安定性は、本酵素をpH4から12で温度30℃で1日加温後、前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則りpH処理後の残存活性を測定して確認した。本酵素のpH安定性を図4に示す。結果本酵素は、pH9付近で安定であり、pH6付近からpH11付近までは比較的安定であった。

#### 【0052】

8. 至適pHは、本酵素を温度37℃でpH4から12で前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り酵素活性を測定して確認した。本酵素の至適pHを図5に示す。本酵素は、pH8からpH8.5付近で最もよく作用した。

#### 【0053】

9. 金属イオンの影響は、0.5 mol/L N-アセチル-D-バリンと本酵素液 (500 U) を含む反応液に、終濃度 1 mmol/L になるように、塩化カルシウム・2水和物、塩化鉄(III)・6水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルト(II)・6水和物、塩化カリウム、塩化ニッケル・6水和物、塩化マグネシウム・6水和物、硫酸銅(II)・5水和物、塩化マンガン(II)・4水和物、塩化亜鉛、モリブデン酸ナトリウムを添加して、40℃で1日加温し、生成されたD-バリン量を以下に記述するHPLC法により測定し、検出されたN-アセチル-D-バリンとD-バリンの面積比から各金属を添加した場合の分割率を求め、金属イオン無添加における分割率を100として相対値を求めた。

その結果、表3に示すように本酵素は1 mmol/Lの $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で活性が阻害された。

#### 【0054】

HPLC測定法は、Inertsil ODS-2 (GLサイエンス (株) 製) カラムを用い、0.015% 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム (pH2.5) 80:アセトニトリル20緩衝液を用い、流速0.5 mL/分、検出230 nm、カラム温度30℃でHPLC分析した。

#### 【0055】

【表3】

金属イオン	1.0 mmol / L	相対活性 (%)
無添加		100
塩化カルシウム		99
塩化鉄 (III)		88
塩化ナトリウム		99
塩化コバルト (II)		27
塩化カリウム		92
塩化ニッケル		20
塩化マグネシウム		90
硫酸銅 (II)		90
塩化マンガン (II)		48
塩化亜鉛		31
モリブデン酸ナトリウム		105

#### 【0056】

10. 阻害剤の影響は0.5 mol/L N-アセチル-D-バリンと本酵素液(500 U)を含む反応液に、終濃度5 mmol/Lとなるようにエチレンジアミン四酢酸、2-メルカプトエタノール、N-エチルマレイミド、o-フェナントリン、L-システイン、ヨードアセトアミド、ジチオスレイトールを添加して40℃で1日加温し、生成されたD-バリン量を前述したHPLC法により測定し、検出されたN-アセチル-D-バリンとD-バリンの面積比から各阻害剤を添加した場合の分割率を求め、阻害剤無添加における分割率を100として相対値を求めた。

その結果、表4に示すように本酵素は5.0 mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害された。

【0057】

【表4】

阻害剤 5 mmol/L	相対活性 (%)
エチレンジアミン四酢酸	112
2-メルカプトエタノール	47
N-エチルマレイミド	100
o-フェナントリン	53
L-システイン	78
ヨードアセトアミド	107
ジチオスレイトール	38

【0058】

#### 実施例5 D-バリンの製造

15% N-アセチル-D, L-バリン水溶液を基質として用い、デフルビバクター エスピー A131-3株由来のD-アミノアシラーゼが基質水溶液1 mL当たり200 Uの酵素量を添加し、40℃で3日間反応を行い、生成されたN-アセチル-D, L-バリンからD-バリンの分割生成率を、実施例1(2)記載のHPLC測定法で測定した。結果を図6に示す。

本酵素を基質水溶液に200 U/mL含有する系で、反応1日目でN-アセチル-D, L-バリン中のN-アセチル-D-バリンの90%以上がD-バリンに変換されており、その分割率は90%以上であった。

また、N-アセチル-L-バリンはまったく分解されず、本酵素がD-アミノ酸の製造に関して実用性を有することが確認された。

#### 【0059】

##### 【発明の効果】

本発明のデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物より得られた新規なD-アミノアシラーゼは、基質特異性が高く、N-アセチル-D, L-アミノ酸 (例えば、N-アセチル-D, L-バリン、N-アセチル-D, L-メチオニン、N-アセチル-D, L-トリプトファン、N-アセチル-D, L-ロイシン、N-アセチル-D, L-フェニルアラニン、N-アセチル-D, L-チロシン等) よりD-アミノ酸を簡便かつ効率的さらに安価に製造することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

###### 【図1】

本酵素の電気泳動法による分子量測定時の電気泳動像を示す図である。

###### 【図2】

本酵素の温度安定性測定時の残存活性を示す図である。

###### 【図3】

本酵素の至適温度測定時の相対活性を示す図である。

###### 【図4】

本酵素のpH安定性測定時の残存活性を示す図である。

###### 【図5】

本酵素の至適pH測定時の相対活性を示す図である。

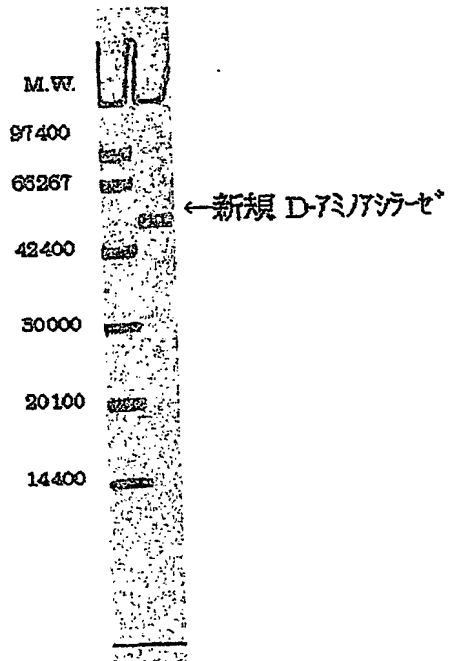
###### 【図6】

N-アセチル-D, L-バリンの分割率を示す図である。

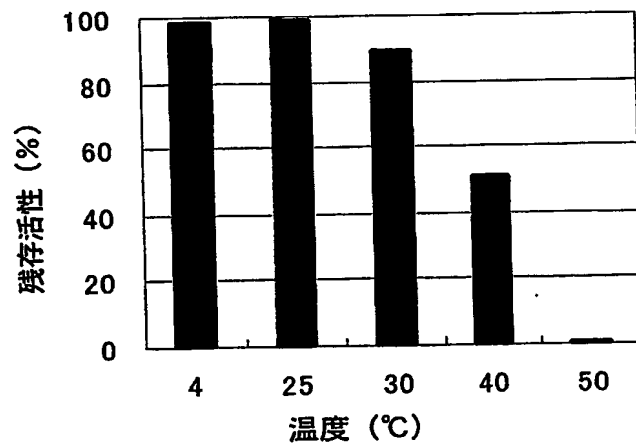
【書類名】

図面

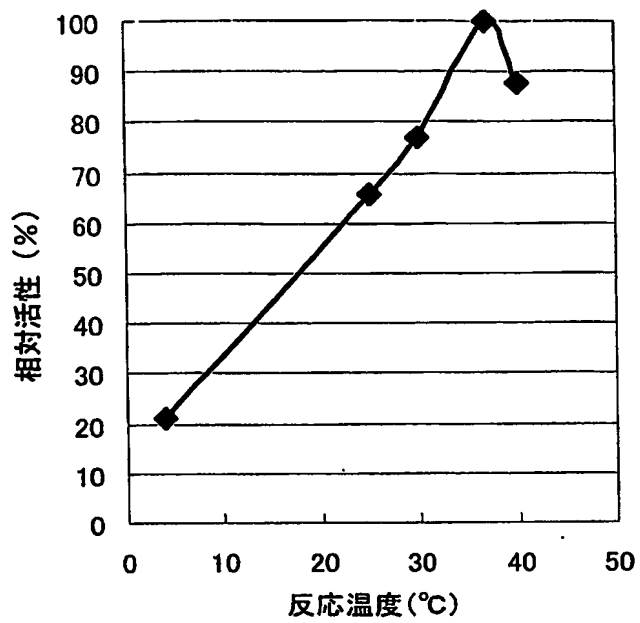
【図 1】



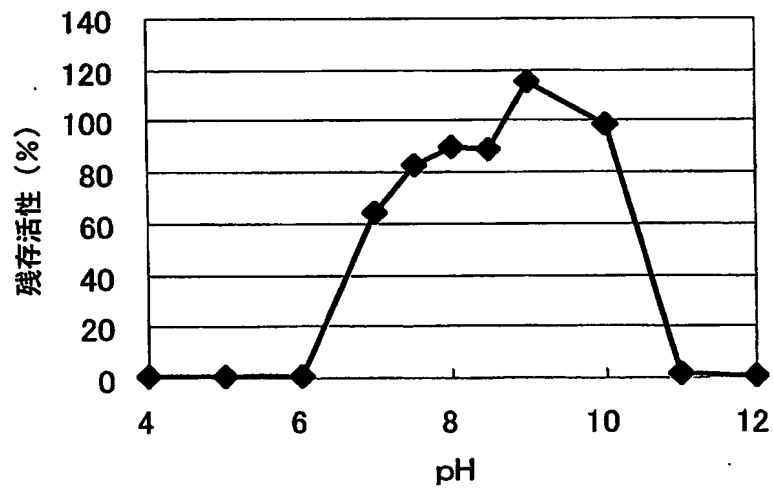
【図 2】



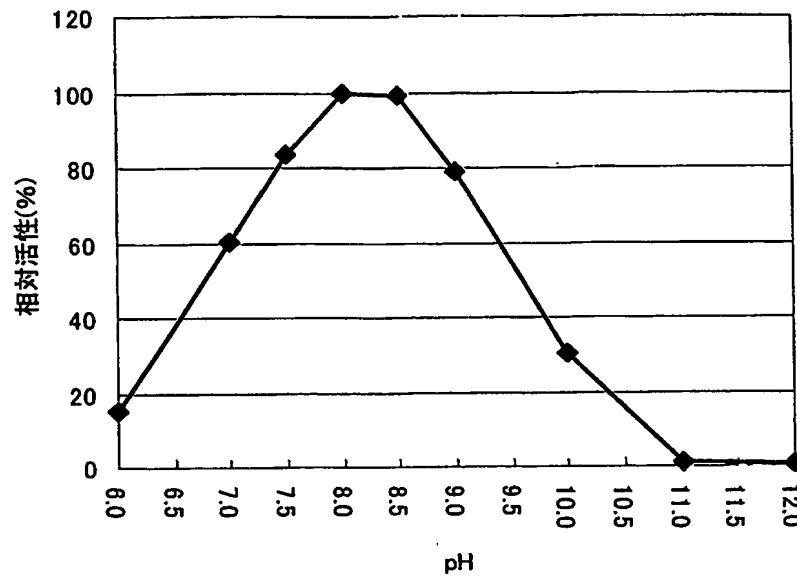
【図 3】



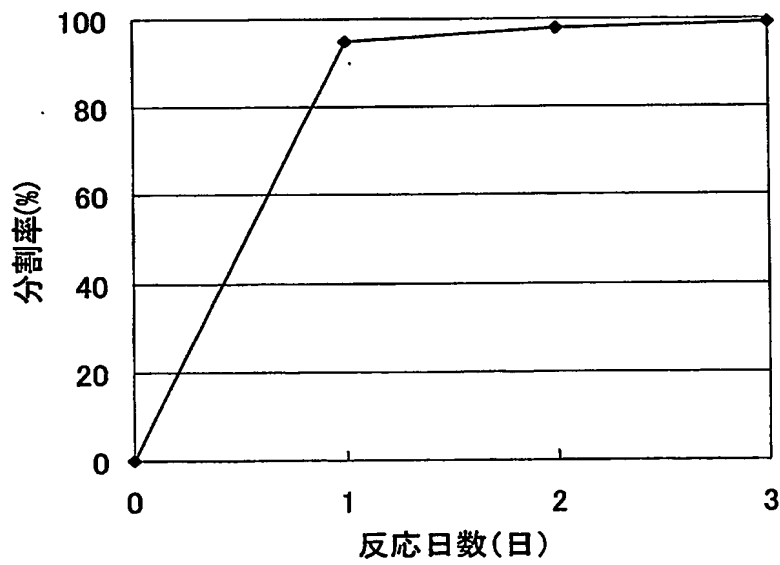
【図 4】



【図 5】



【図 6】





【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 デフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物が生産する N-アセチル-D-アミノ酸に作用し、分子量 (電気泳動) 約 55,000 ダルトン、等電点 (変性系 2 次元電気泳動) 5.3、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン等に作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン等に作用しない、至適温度 37℃ (pH 8)、至適 pH 8~8.5 (37℃)、1 mmol/L の  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  で活性が阻害され、5 mmol/L のジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される D-アミノアシラーゼ。

【効果】 新規な D-アミノアシラーゼは、基質特異性が高く、N-アセチル-D, L-アミノ酸より D-アミノ酸を簡便かつ効率的さらに安価に製造することができる。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 6 6 3 8 9
受付番号	5 0 2 0 1 9 1 6 2 6 4
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0 0 9 3
作成日	平成 1 4 年 1 2 月 1 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 14 年 12 月 18 日
-------	-------------------

特願 2002-366389

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390037327]

1. 変更年月日	1990年12月12日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋3丁目13番5号
氏 名	第一化学薬品株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[302068704]

1. 変更年月日

2002年12月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

岩手県盛岡市黒石野3丁目15-40

氏 名

磯部 公安